

<p>94-118618/14 B04 NIPPON SHOJI KAISHA LTD 92.09.11 92JP-243098 (94.03.31) G01N 33/86, C12Q 1/56 Assaying activity of blood coagulation factor - by mixing specimen with fibrin deposit inhibitor and opt. fibrinogen, adding thrombin, measuring clotting time in presence of calcium ions and comparing with standard clotting time. (Jpn) C94-054947 N(US) R(AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE) Addnl. Data: ENOMOTO M; YAMAGUCHI M 93.09.03 93WO-JP01247</p>	<p>B(4-B4D4, 4-B4D5, 4-H19, 11-C8E, 12-K4A2)</p>
<p>Assaying activity of blood coagulation Factor XIII comprises (1) mixing a specimen with a fibrin deposit inhibitor and opt. fibrinogen; (2) adding a thrombin soln. to the resultant mixt.; (3) measuring the fibrin clotting time in the presence of Ca ions; and (4) comparing the measured time with the standard fibrin clotting time. Also claimed a kit for the above purpose which comprises thrombin, Ca ion and fibrin deposit inhibitor and opt. fibrinogen. ADVANTAGE The method is accurate, rapid and simple.</p>	<p>EXAMPLE Normal blood plasma or blood with Factor XIII deficiency (50 µl) was added, as was 50 µl of 15 mg/ml fibrinogen (from human blood) dissolved in 0.3 mol/l NaCl and 0.2 ml/l HEPES at pH 7.0. The mixt. was heated at 37°C for 2 min. 100 µl 100 NIHU/ml soln. of thrombin dissolved in 20 mmol/l NaCl. Various materials were added into 50 µl test sample and clotting time was tested. The results for the following materials, H₂O Urea (5 mol/l), NaI (1.5 mol/l) and Gly-Pro-Arg-Pro (3 mmol/l) were as follows for normal plasma, 3.9 sec, 75.8 sec., 73 sec. and 34.7 secs respectively and for factor XIII deficient blood; 4 sec, 91.9 secs, 90.4 secs, and 35.6 secs respectively. (23pp2418SBDwgNo0/2). SR:EP535799 JP03067173 JP68560763 WO9407145-A</p>

BEST AVAILABLE COPY

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



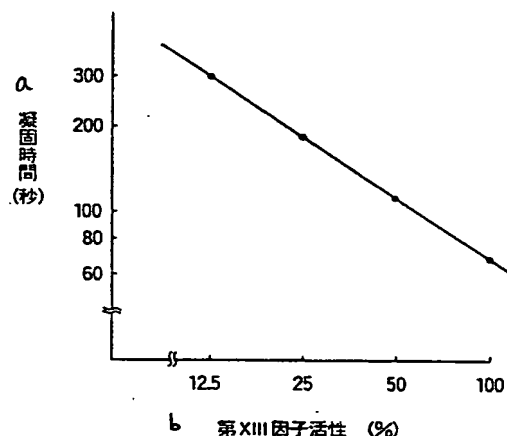
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 G01N 33/86, C12Q 1/56	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/07145 (43) 国際公開日 1994年3月31日 (31.03.1994)
(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01247 (22) 国際出願日 1993年9月3日 (03. 09. 93) (30) 優先権データ 特願平4/243098 1992年9月11日 (11. 09. 92) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本商事株式会社 (NIPPON SHOJI KAISHA, LTD.) (JP/JP) 〒540 大阪府大阪市中央区石町2丁目2番9号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 榎本昌泰 (ENOMOTO, Masayasu) (JP/JP) 〒569 大阪府高槻市郡家新町20-29 Osaka, (JP) 山口誠博 (YAMAGUCHI, Masahiro) (JP/JP) 〒565 大阪府吹田市藤白台1-1 D-18 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 青山 稔, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号 ツイン21 MIDタワー内 Osaka, (JP) (81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書		

(54) Title : METHOD OF ASSAYING ACTIVITY OF BLOOD COAGULATION FACTOR XIII AND REAGENT KIT THEREFOR

(54) 発明の名称 血液凝固第XIII因子活性測定方法および該測定用試薬キット

a ... Clotting time (sec)
b ... Factor XIII activity (%)



(57) Abstract

An accurate, rapid and simple method for assaying the activity of blood coagulation factor XIII and a reagent kit for use in said method. The method comprises mixing a specimen with a fibrin deposit inhibitor and optionally further with fibrinogen, adding a thrombin solution to the resultant mixture, measuring the fibrin clotting time in the presence of calcium ions, and comparing the measured time with the standard fibrin clotting time. The reagent kit is composed of thrombin, calcium ions, a fibrin deposit inhibitor, and optionally further fibrinogen.

(57) 要約

血液凝固第 XIII 因子活性の正確、迅速かつ簡便な測定方法およびそのための試薬キットを提供する。検体とフィブリン析出阻害剤とを混合した後、あるいは検体とフィブリノゲンとフィブリン析出阻害剤とを混合した後、トロンビン溶液を加え、カルシウムイオン存在下でフィブリン凝固時間を測定し、その凝固時間を標準と比較する。該測定方法のための試薬キットは、トロンビンと、カルシウムイオンと、フィブリン析出阻害剤よりなり、さらにフィブリノゲンと組み合わせることもできる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	CS	チェッコスロヴァキア	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	CZ	チェッコ共和国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	DK	デンマーク	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナファソ	ES	スペイン	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BG	ブルガリア	FI	フィンランド	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BJ	ベナン	FR	フランス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BR	ブラジル	GA	ガボン	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BY	ベラルーシ	GB	イギリス	ML	マリ	TD	チャド
CA	カナダ	GN	ギニア	MN	モンゴル	TG	トウゴ
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	US	米国
CH	スイス	IE	アイルランド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン共和国
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NL	オランダ	VN	ベトナム
CM	カメルーン	JP	日本	NO	ノルウェー		
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド		

明 細 書

血液凝固第XIII因子活性測定方法および該測定用試薬キット

技術分野

本発明は血液凝固第XIII因子(以下、第XIII因子と称する)の活性測定方法および該測定用試薬キットに関する。

背景技術

第XIII因子はフィブリン安定化因子とも呼ばれ、トロンビンとカルシウムイオンにより活性化されると、血液凝固反応の最終段階においてフィブリン分子間およびフィブリンと他のタンパク質との間にトランスグルタミナーゼ反応によって架橋反応を進行させ、安定なフィブリン塊等を形成し、線溶抵抗性の獲得と繊維芽細胞の接着担体形成を促進する役割を担うタンパク質である。平常は血液中に不活性状態で存在するが、出血などで血液凝固が起これトロンビンが生成すると、このトロンビンとカルシウムイオンの作用により活性化され、フィブリンを安定化する。

従って、第XIII因子が減少もしくは欠損している血液では、血液凝固時間は正常閾値を示すが、形成されたフィブリン塊は脆弱であり、後出血などの特有の現象を呈する他に創傷治癒遅延の傾向を示す。このように第XIII因子が減少もしくは欠損する事例としては、先天性の欠乏症、播種性血管内凝固(DIC)、重症肝疾患、悪性腫瘍、白血病、第XIII因子インヒビター獲得者、大手術等が挙げられる。従って、第XIII因子の測定は病気の診断や治療効果を判定する上で重要であり、第XIII因子の正確、迅速、簡便な測定方法の確立が要望されている。

しかしながら、これまでの測定方法は、この要望を十分に満足するもの

ではなかった。即ち、第XIII因子測定 of 従来法としては、血漿を凝固させたクロット(フィブリン塊)が1%モノクロール酢酸などの希薄な酸や5~8mol/lの尿素液によって溶解するか否かを調べるクロット溶解による定性法、抗体中和や希釈系列作製後のクロット溶解法による半定量法、その他免疫学的方法や活性第XIII因子のトランスグルタミナーゼ活性を利用したアミン取り込み法による定量方法が知られている[例えば、日本臨床47巻、1989年増刊号、846~848頁、臨床検査Vol. 27、No. 8、848~853頁(1983年8月)]が、まず、定性法や半定量法は正確な第XIII因子活性が求まるものではない。

また、免疫学的方法、即ち、第XIII因子に対する抗体を用い、第XIII因子を抗原として捕える方法(例えば、特開昭59-192961号、特開昭63-184061号)は、一般的に操作が煩雑であり、測定に数時間を要する。また、抗原量としての測定であるため、生体内での第XIII因子活性を正確に反映しないという問題点がある。

さらに、定量的に第XIII因子活性を測定するアミン取り込み法としては、検体中の第XIII因子をトロンビンとカルシウムイオンで活性化し活性第XIII因子を形成させた後、カルボニル基質としてカゼイン、フェニルプロピオニルチオコリン、ブチリルピラゾール等を用い、アミン基質としてモノダンシルカダベリン、プトレシン、グリシンエチルエステル、ヒスタミン等の合成基質を用いて、カルボニル基質にアミン基質を取り込ませるラジオアイソトープ法、蛍光法[例えば、特開昭58-216959号]やアミン取り込み反応により形成されるアンモニアをNADHまたはNADPHとGLDH(グルタミンデヒドロゲナーゼ)およびケトグルタレートを用いNADまたはNADPの生成反応に導く方法[クリニカル・ケミストリー (Clin. Chem.), Vol. 31, No. 1, 35~40頁、

1985；特開平1-309700号]がある。これらの方法では検体中のフィブリノゲンを不活化するために第XIII因子を活性化する前に56℃で3または4分加温し、冷却するという操作を必要とする。また、活性化第XIII因子測定の実験時間は10～30分であり、反応停止後、遠心操作またはカラム操作を必要とする。従って、操作は煩雑であり、長時間を要し、測定の正確性にも問題がある。さらには、ラジオアイソトープ法では放射性物質を取り扱うために設備にかなりの投資が必要であり経済的負担も大きい。

前記したアミン取り込み法のうち、特開平1-309700号の方法では、フィブリノゲン-フィブリンの影響を除く目的で、フィブリン凝集阻害剤グリシン-プロリン-アルギニン-プロリンを用いる。そのフィブリン凝集阻害剤存在下でグルタミン含有ペプチド、例えば、ロイシン-ロイシン-グリシン-プロリン-グリシン-グルタミン-セリン-リジン-バリン-イソロイシン-グリシンアミドと第1級アミンを用い、形成されるアンモニアを測定する。この方法では特殊なペプチドを用いるため高価となる。また、測定に関与する反応が多く、誤差を生じ易い。さらには、検体中に存在するアンモニアも測定に影響し得る。

発明の目的

本発明の目的は、このような従来法の問題点を解消し、正確、迅速、かつ簡便な第XIII因子活性の測定方法およびかかる測定のための試薬キットを提供することにある。

このような目的を達成するために、本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、トロンビンによりフィブリノゲンをフィブリンとし、トロンビンとカルシウムイオンで第XIII因子を活性化し、活性化第XIII因子がフィブリンを架橋させフィブリン塊を形成する一連の反応をフィブリン析出阻害剤

の存在下で行い、形成されるフィブリン塊が析出する凝固時間を測定し、標準と比較することにより第XIII因子活性が求められることを見出し、本発明を完成するに至った。

図面の簡単な説明

図1は、以下の実施例3において、フィブリノゲンを試薬として用いない方法1で、種々の濃度の検体を用いて測定した第XIII因子活性と凝固時間の関係を示すグラフである。

図2は、以下の実施例4において、フィブリノゲンを試薬として用いる方法2で、種々の濃度の検体を用いて測定した第XIII因子活性と凝固時間の関係を示すグラフである。

発明の概要

本発明は、検体とフィブリン析出阻害剤とを混合した後、トロンビン溶液を加え、カルシウムイオン存在下でフィブリン凝固時間を測定し、その凝固時間を標準の凝固時間と比較して検体中の第XIII因子活性を求めることを特徴とする第XIII因子活性測定方法（以下、方法1という）を提供するものである。

また、本発明は、検体と、フィブリノゲンと、フィブリン析出阻害剤とを混合した後、トロンビン溶液を加え、カルシウムイオン存在下でフィブリン凝固時間を測定し、その凝固時間を標準の凝固時間と比較して検体中の第XIII因子活性を求めることを特徴とする第XIII因子活性測定方法（以下、方法2という）を提供するものである。

発明の詳細な説明

第XIII因子の作用は生体内でのフィブリンクロット形成であり、その形成は血液中で生じたフィブリンを基質とし、その架橋反応を行うものである。従って、方法1により、血液中でフィブリンクロット形成能全体

を知ることができ、それにより第XIII因子活性が求まる。また、方法2により、第XIII因子含有検体中のフィブリノゲンだけでなく、試薬としてフィブリノゲンを補充することにより、正味の第XIII因子活性をより正確に測定することができる。

本発明の測定方法では、従来の方法と異なり、第XIII因子活性を、フィブリン塊が析出する凝固時間を測定することにより行う。即ち、フィブリノゲンがトロンビンによりフィブリンとなり、活性化第XIII因子によりフィブリンが架橋され、フィブリン塊となる反応を第XIII因子活性に依存した凝固時間として測定する方法は従来全く見当たらない。

例えば、外因系凝固反応のスクリーニング検査であるプロトロンビン時間や内因系凝固反応のスクリーニング検査である活性化部分トロンボプラスチン時間の測定のような凝固時間で測定する方法では、第XIII因子活性に関係なくフィブリン析出が生じ凝固時間が測定される[U S - A - 3 3 2 3 9 9 5 ; メディカル・テクノロジー (Medical Technology) , Vol. 13, No. 7, 726~729頁(1985 臨時増刊)]。また、フィブリノゲン量の測定に日常検査として用いられているトロンビン時間法では、フィブリノゲン(検体)にトロンビンを加えて、フィブリンが生成されるまでの時間を測定するが、この測定でも第XIII因子の存在の有無に関係なく凝固時間は測定される。即ち、トロンビンによりフィブリノゲンがフィブリンになるとフィブリンが重合し、析出が生じ、凝固時間として測定される。従って、血液凝固反応での凝固時間は第XIII因子活性に依存しないで測定されてしまう。

このように、フィブリノゲン溶液にトロンビン溶液を添加すると、第XIII因子に依存しない凝固が生じる。例えば、フィブリノゲン溶液(2 mg/ml) 200 μ l にトロンビン溶液(100 NIH U/ml) 100 μ l を添

加すると、第XIII因子が存在しないにも拘わらず、フィブリン析出が生じ、10秒以内に凝固する。従って、このままでは第XIII因子の測定は行えない。本発明では、フィブリン析出を阻害し、第XIII因子の活性に応じた凝固が起こる系において凝固時間を測定することにより第XIII因子の活性を測定する。

この点、前記特開平1-309700号には、フィブリノゲン-フィブリンの影響を除く目的でフィブリン凝集阻害剤(グリシン-プロリン-アルギニン-プロリン)を添加して、第XIII因子活性を測定することが開示されているが、検出する方法はアンモニア発生の測定であり、凝固時間法で測定する本発明の方法とは全く異なるものである。

次に、本発明の測定方法で用いる検体および試薬類について説明する。

検体

本発明の方法の対象となる検体は、通常、血漿であり、全血でもよい。常法に従って被検者から採血し、血漿を分取する。

フィブリン析出阻害剤

今回、上記反応でフィブリン析出を阻害する条件、即ち、フィブリノゲンがトロンビンによりフィブリンとなり、生成したフィブリンができるだけ長時間析出(重合)ないし凝固しない条件と、第XIII因子がトロンビンとカルシウムイオンによって活性化され、活性化された第XIII因子はフィブリンを架橋させる作用を発揮できる条件とが判明し、本発明はかかる知見に基づいてなされたものである。

ここに、本明細書中においては、フィブリン析出を阻害する条件および第XIII因子活性が発揮される条件の二つの条件を付与する物質をフィブリン析出阻害剤という。

本発明におけるフィブリン析出阻害剤としては、その作用を有するもの

であればいずれでもよく、特に限定されるものではない。その例としては、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム等でのナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、ヨウ素イオン、塩素イオン等(カルシウムイオンは第XIII因子活性化に必要な成分であるが、フィブリン析出阻害剤としても使用できる)や、尿素、SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)のような蛋白変性剤、ジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリトリートール(DTE)、2-メルカプトエタノール、 β -チオジグリコールのようなSH試薬、EDTA(Ethylenediamine tetraacetic Acid)、EGTA(Ethylene Glycol Bis(β -aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetic Acid)のようなキレート試薬、グリシン-プロリン-アルギニン-プロリンのようなペプチド、塩化テトラエチルアンモニウム、塩化ベンジルトリエチルアンモニウム、硫酸アンモニウム、コール酸ナトリウム、フェリシアン化カリウム、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、エチレングリコール、ヘキサメチレングリコール等が挙げられる。本発明においては、これらのフィブリン析出阻害剤のうち1種、あるいは2種以上を組み合わせる用いることができる。

また、フィブリン析出阻害剤は、反応液のpHによりその阻害作用が異なる場合があるが、析出阻害作用が十分に発揮されるpHで使用するのが好ましく、例えば、実施例に示すごとく、弱酸性とすることによってフィブリン析出阻害作用が十分発揮される場合は、緩衝剤を用いてpHを弱酸性域に調節する。これらの場合、反応液の最終pHは5.0~8.0の範囲、好ましくは6.0~7.0の範囲とし、緩衝剤の濃度は2~2000mmol/lの範囲、好ましくは20~400mmol/lの範囲とする。pH調節用の緩衝剤としてはトリス、バルビタール、イミダゾール、ペロナール、グリシ

ルグリシン、MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、HEPES、ACES、MOPUSO、BES、MOPUS等が挙げられる。

フィブリン析出阻害剤としての各物質添加の反応液中での濃度は、イオンとしてのナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、ヨウ素イオン、塩素イオンはヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム等の塩であり、添加濃度は0.1~5000mmol/lである。蛋白変性剤としての尿素は0.1~3000mmol/l、SDSは0.01~1.0% (w/v)である。SH試薬としてのDTT、DTEは0.1~1000mmol/l、2-メルカプトエタノールは0.1~2000mmol/l、 β -チオジグリコールは0.1~3000mmol/lである。キレート試薬としてのEDTA、EGTAは0.1~500mmol/lである。ペプチドとしてのグリシン-プロリン-アルギニン-プロリンは0.01~10mmol/lである。塩化テトラエチルアンモニウムは0.1~5000mmol/l、塩化ベンジルトリエチルアンモニウムは0.1~3000mmol/l、硫酸アンモニウムは0.1~2000mmol/l、コール酸ナトリウムは0.01~10% (w/v)、フェリシアン化カリウムは0.1~500mmol/l、ジメチルスルホキシドは0.01~40% (v/v)、ジメチルホルムアミドは0.01~40% (v/v)、エチレングリコールは0.01~40% (v/v)、ヘキサメチレングリコールは0.1~5000mmol/lである。これら物質の好ましい濃度はpHと各々の物質の組み合わせに応じて適宜選択することができる。

なお、これまでにフィブリン凝集(析出)を阻害する物質として、フィブリン析出に影響するものとして、または、析出フィブリンを溶解するものとして、グリシン-プロリン-アルギニン残基を有するペプチド、尿素、塩化ベンジルトリエチルアンモニウム、塩化テトラエチルアンモニウム、

酸やイオン強度が知られている[バイオケミストリー (Biochemistry), Vol. 19、1013~1019、1980; ブラッド (Blood), Vol. 50、619~624、1977]が、これらの物質等はフィブリン同士
の重合反応の研究、フィブリンモノマー調製やフィブリンクロット溶解の
ために用いられたにすぎず、本発明のごとく第XIII因子活性を凝固時間
法で測定する方法に用いられていたものではない。

トロンビン、フィブリノゲン、カルシウムイオン

本発明の測定方法では、フィブリノゲンおよびトロンビンとして、ヒト、
ウシ、ウマ、ヤギ等の血液由来のものが使用できる。カルシウムイオンと
しては、塩化カルシウム、グルコン酸カルシウム等のカルシウム塩からの
ものが使用できる。これらの試薬およびフィブリン析出阻害剤はいずれも
商業的に入手可能である。また、フィブリノゲン試薬、トロンビン試薬お
よびフィブリン析出阻害剤試薬は必要に応じてpH調節し、pH調節の緩衝
剤としては、トリス、バルビタール、イミダゾール、ペロナール、グリシ
ルグリシンやMES、Bis-Tris、ADA、PIPES、HEPES、
ACES、MOPUSO、BES、MOPS等が挙げられる。これらの緩
衝剤も商業的に入手可能である。

各試薬の濃度は適時選択することができるが、フィブリノゲン試薬のフィ
ブリノゲン量は反応液中で0.01~100mg/ml、好ましくは0.5~
10mg/mlが望ましい。トロンビン試薬のトロンビンは反応液中で1~
20000NIHU/ml、好ましくは20~500NIHU/mlが望まし
い。トロンビン試薬は、一般に、検体とフィブリノゲン試薬とフィブリン
析出阻害試薬の混合液100 μ l当り、20~300 μ l程度の割合で用い
られる。カルシウムイオンはフィブリノゲン試薬、フィブリン析出阻害試
薬、トロンビン試薬の何れかまたは何れにも処方してもよいが、反応液中

での濃度は、0.1～1000mmol/l、好ましくは5～100mmol/lが望ましい。なお、フィブリノゲン試薬、トロンビン試薬のpH、濃度および緩衝剤の種類はそれぞれ選択することができる。

さらに、本発明による測定においては、各種物質の影響の除去、試薬の性能や品質の維持、製造等を目的として、フィブリノゲン試薬、フィブリン析出阻害試薬、トロンビン試薬に各種の物質を適時添加することもできる。その例としては、イブシロンアミノカプロン酸、トラネキサム酸、アプロチニン等の抗線溶剤、ポリブレン、プロタミン等のヘパリン阻害物質、アジ化ナトリウム、硫酸ゲンタマイシン、チメロサル等の防腐剤、トリトンX-100、ツィーン-20等の界面活性剤等の他に、糖類、アミノ酸類、アルブミン等のタンパク質、ポリエチレングリコール、グリセロール等の物質が挙げられる。

次に、本発明の測定方法の具体的操作について説明する。

本発明による第XIII因子活性測定の方法1としてのフィブリノゲン試薬を用いない方法においては、所定量の検体血漿あるいはその希釈液とフィブリン析出阻害剤試薬を混合し、15～45℃、通常、37℃で1～10分、好ましくは2～5分間加温後、トロンビン試薬を添加し、同温度で凝固時間を測定することにより行う。フィブリン析出阻害剤試薬をトロンビン試薬に処方してもよい。その場合は検体のみをあらかじめ加温する。方法2においては、所定量の検体血漿あるいはその希釈液と、フィブリノゲン試薬と、フィブリン析出阻害剤試薬とを混合し、15～45℃、通常、37℃で1～10分、好ましくは、2～5分間加温後、トロンビン試薬を添加し、同温度で凝固時間を測定することにより行う。フィブリン析出阻害剤はフィブリノゲン試薬、トロンビン試薬のいずれか、または両方に処方してもよいし、別試薬としてもよい。別試薬とした場合は、トロンビン試薬

添加前に検体とフィブリノゲン試薬の混合液に添加するが、添加の順序は特に限定されるものではない。本発明の測定方法における温度および加温時間は厳密ではなく、前記範囲から選択される一定の反応温度が達成されれば足りる。別途、標準として正常血漿を希釈液または第XIII因子欠乏血漿で種々の濃度に希釈し、同様に凝固時間を測定し、希釈度に対して凝固時間をプロットして検量線を得る。得られた検量線より、正常血漿の第XIII因子活性に対する割合として表示することにより検体中の第XIII因子活性が求まる。

検体を希釈する場合は、通常、生理的食塩水またはpH 5.5～8.5の緩衝液、例えば、ミカエリス緩衝液、トリス塩酸緩衝液、オーレン・ペロナール緩衝液、イミダゾール緩衝液、HEPES、BES、MOPS等のグッド緩衝液等を用いて行い、それら希釈溶液にフィブリノゲンやフィブリン析出阻害剤を含有させることもできる。

かくして、本発明の測定方法によれば、正確かつ迅速、簡便に第XIII因子の活性が測定できる。即ち、前記の試薬を用いる前記操作により、検体中の第XIII因子の活性に依存した凝固時間が生じ、簡単な通常の血液凝固時間測定機器を用いるだけで、正確な第XIII因子の活性の測定を行うことができる。また、測定に要する正味の時間は約5分と短時間である。

また、本発明は、トロンビンと、カルシウムイオンと、フィブリン析出阻害剤よりなる第XIII因子活性を凝固時間法で測定する試薬キット（方法1に対応）、およびフィブリノゲンと、トロンビンと、カルシウムイオンと、フィブリン析出阻害剤よりなる第XIII因子活性を凝固時間法で測定する試薬キット（方法2に対応）を提供するものである。試薬キットの構成試薬のフィブリノゲン試薬、フィブリン析出阻害試薬、トロンビン試薬において、フィブリノゲン試薬、トロンビン試薬にフィブリン析出阻害

試薬の一部、または、全部を含有させてもよい。また、カルシウムイオンはフィブリノゲン試薬、トロンビン試薬、フィブリン析出阻害試薬のいずれか、または、それぞれに含有させることができる。なお、カルシウムイオンはフィブリン析出阻害剤としても使用できる。

本発明の第XIII因子の活性測定用試薬キットは、構成試薬を混合したもの、あるいは各構成試薬の集合体とすることができる。混合試薬、あるいは各構成試薬は、常法に従って、賦形剤と共に反応液中で所定の濃度になるように精製水や緩衝剤に溶解した剤形の、そのまま直接、測定に供することのできる形態、あるいは使用時、適時、所望の濃度に希釈する濃厚液の形態、さらには、凍結乾燥品の形態とすることができる。このうち、凍結乾燥品の形態が通常採用される形態であり、使用に際し精製水または緩衝液で復元する。また、各構成試薬は同一の形態あるいは別の形態とすることができる。

次に参考例および実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。

参考例 1

検体として、市販管理正常血漿カリブラズマ(登録商標、フランス国、ビオメリュー社製)又は、第XIII因子欠乏血漿(米国、シグマ社製) 50 μ lに0.3 mol/l塩化ナトリウムで溶解したヒト血漿由来フィブリノゲン(米国、シグマ社製、フラクションI)15 mg/mlの溶液50 μ lを加え、さらに試料溶液50 μ l添加後、37℃、2分間加温後、20 mmol/l塩化カルシウムで溶解したトロンビン(フランス国、ビオメリュー社製、フィブリノゲンキットの構成品)100 NIHU/ml溶液100 μ lを添加し、凝固時間を凝固時間測定機器KC-4(アメルング社製)で測定した。試料溶液50 μ l中に緩衝剤を添加し、その種類とpHでの凝固時間の関係を調べた。その結果を表1に示す(濃度とpHは試料溶液中である)。

試薬の一部、または、全部を含有させてもよい。また、カルシウムイオンはフィブリノゲン試薬、トロンビン試薬、フィブリン析出阻害試薬のいずれか、または、それぞれに含有させることができる。なお、カルシウムイオンはフィブリン析出阻害剤としても使用できる。

本発明の第XIII因子の活性測定用試薬キットは、構成試薬を混合したもの、あるいは各構成試薬の集合体とすることができる。混合試薬、あるいは各構成試薬は、常法に従って、賦形剤と共に反応液中で所定の濃度になるように精製水や緩衝剤に溶解した剤形の、そのまま直接、測定に供することのできる形態、あるいは使用時、適時、所望の濃度に希釈する濃厚液の形態、さらには、凍結乾燥品の形態とすることができる。このうち、凍結乾燥品の形態が通常採用される形態であり、使用に際し精製水または緩衝液で復元する。また、各構成試薬は同一の形態あるいは別の形態とすることができる。

次に参考例および実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。

参考例 1

検体として、市販管理正常血漿カリプラズマ(登録商標、フランス国、ビオメリュー社製)又は、第XIII因子欠乏血漿(米国、シグマ社製) 50 μ lに0.3 mol/l塩化ナトリウムで溶解したヒト血漿由来フィブリノゲン(米国、シグマ社製、フラクションI) 15 mg/mlの溶液 50 μ lを加え、さらに試料溶液 50 μ l添加後、37℃、2分間加温後、20 mmol/l塩化カルシウムで溶解したトロンビン(フランス国、ビオメリュー社製、フィブリノゲンキットの構成品) 100 NIHU/ml溶液 100 μ lを添加し、凝固時間を凝固時間測定機器KC-4(アメルング社製)で測定した。試料溶液 50 μ l中に緩衝剤を添加し、その種類とpHでの凝固時間の関係調べた。その結果を表1に示す(濃度とpHは試料溶液中である)。

表 1

正常血漿および第XIII因子欠乏血漿の凝固時間

緩衝剤	濃度	pH	正常血漿	第XIII因子欠乏血漿
H ₂ O			3.6秒	3.7秒
トリス-塩酸	0.25mol/l	8.2	4.1	4.0
		7.4	4.6	4.5
		6.6	5.7	6.0
HEPES	0.25mol/l	8.2	3.5	3.6
		7.4	4.1	4.1
		6.6	4.8	4.8
Bis-Tris	0.2mol/l	7.0	4.4	4.4
		6.6	6.9	7.0
		6.2	11.3	11.3
		5.8	19.6	17.6

pHの低下で正常血漿および第XIII因子欠乏血漿とも凝固時間が延長し、フィブリン析出が抑制された。しかし、正常血漿と第XIII因子欠乏血漿での凝固時間に差は特に認められない。

実施例 1

検体として、市販管理正常血漿カリブラズマ、または、第XIII因子欠乏血漿50 μ lに0.3mol/l塩化ナトリウム、0.2mol/l HEPES

pH 7.0で溶解したヒト血漿由来フィブリノゲン15mg/mlの溶液50 μ lを加え、さらに試料溶液50 μ l添加後、37℃、2分間加温後、20 mmol/l塩化カルシウムで溶解したトロンビン100NIHU/ml溶液100 μ lを添加し、凝固時間を凝固時間測定機器KC-4で測定した。試料溶液50 μ l中に各種物質を添加し、その効果を調べた。その結果を表2に示す(添加濃度は試料溶液中における濃度である)。

表2

正常血漿および第XIII因子欠乏血漿の凝固時間

添加物質	濃度	正常血漿	第XIII因子欠乏血漿
H ₂ O		3.9秒	4.0秒
尿素	5.0mol/l	75.8	91.9
ヨウ化ナトリウム	1.5mol/l	73.0	90.4
ヨウ化カリウム	1.5mol/l	111.5	164.9
塩化マグネシウム	1.0mol/l	100.6	111.2
S D S	0.5%	52.0	128.7
塩化ベンジルトリ エチルアンモニウム	0.5mol/l	171.8	198.7
コール酸ナトリウム	5.0%	96.8	104.8
Gly-Pro-Arg-Pro	3.0mmol/l	34.7	35.6
D T T	100mmol/l	8.5	8.7
D T E	100mmol/l	8.7	9.6
E D T A	50mmol/l	170.5	170.7
E G T A	50mmol/l	49.6	53.8

各種物質の添加により凝固時間は延長し、尿素、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、塩化マグネシウム、SDS、塩化ベンジルトリエチルアンモニウム、コール酸ナトリウムでは正常血漿と第XIII因子欠乏血漿の凝固時間差、即ち、第XIII因子活性の有無による凝固時間差が5.0秒以上生じ、フィブリン析出阻害剤としての効果が認められた。本検討条件ではGly-Pro-Arg-Pro、DTT、DTE、EDTA、EGTAでフィブリン析出阻害剤としての効果はほとんど認められない。

実施例 2

検体として、市販管理正常血漿カリプラズマ、または、第XIII因子欠乏血漿50 μ lに1.0 mol/l塩化ナトリウム、0.2 mol/l HEPES pH 6.6で溶解したヒト血漿由来フィブリノゲン15 mg/mlの溶液50 μ lを加え、さらに試料溶液50 μ l添加後、37℃、2分間加温後、40 mmol/l塩化カルシウム、0.2 mol/l HEPES pH 6.6で溶解したトロンビン100 NIHU/ml溶液100 μ lを添加し、凝固時間を凝固時間測定機器KC-4で測定した。試料溶液50 μ l中に各種物質を添加し、その効果を調べた。その結果を表3に示す(添加濃度は試料溶液中における濃度である)。

表 3

正常血漿および第XIII因子欠乏血症の凝固時間

添加物質	濃度	正常血漿	第XIII因子欠乏血漿
H ₂ O		15.1秒	16.1秒
尿素	2.5mol/l	104.6	135.9
ヨウ化ナトリウム	1.0mol/l	123.9	173.3
ヨウ化カリウム	1.0mol/l	163.3	245.4
塩化マグネシウム	0.5mol/l	83.6	111.4
塩化カルシウム	0.4mol/l	79.4	110.4
D T T	0.1mol/l	44.4	58.7
D T E	0.1mol/l	42.1	51.7
2-メルカプト エタノール	0.2mol/l	37.4	44.3
β -ジチオグリコール	0.5mol/l	32.7	40.7
E D T A	40mmol/l	88.3	124.1
E G T A	50mmol/l	143.3	191.3
Gly-Pro-Arg-Pro	1.0mmol/l	61.9	73.2
塩化テトラエチル アンモニウム	0.5mmol/l	78.7	99.3
塩化ベンジルトリ エチルアンモニウム	0.2mol/l	125.2	147.6
硫酸アンモニウム	1.0mol/l	20.5	30.3
コール酸ナトリウム	2.0%	96.3	105.5
フェリシアン化 カリウム	0.1mol/l	38.7	45.7
ジメチルスルホキシド	40.0%	138.6	165.5
ジメチルホルムアミド	10.0%	50.5	58.1
エチレングリコール	40.0%	63.1	79.1
ヘキサメチレン グリコール	1.0mol/l	124.5	166.0

塩化ナトリウム、塩化カルシウムの高濃度および弱酸性の条件下で、各種物質の添加により凝固時間は延長し、尿素、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、DTT、DTE、2-メルカプトエタノール、 β -ジチオグリコール、EDTA、EGTA、グリシン-プロリン-アルギニン-プロリン、塩化テトラエチルアンモニウム、塩化ベンジルトリエチルアンモニウム、硫酸アンモニウム、コール酸ナトリウム、フェリシアン化カリウム、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、エチレングリコール、ヘキサメチレングリコールで正常血漿と第XIII因子欠乏血漿の凝固時間差、即ち、第XIII因子活性の有無による凝固時間差が5.0秒以上生じ、フィブリン析出阻害剤としての効果が認められた。実施例2では実施例1で認められなかった多くの物質にフィブリン析出阻害効果を認めた。実施例1と2は塩濃度、緩衝剤濃度とpHが異なり、実施例2では実施例1より添加物質の低濃度でその効果が認められた。

実施例3

市販管理正常血漿カリプラズマ(第XIII因子活性を100%とする)と、第XIII因子欠乏血漿(第XIII因子活性を0%とする)を混合し、第XIII因子活性100%、50%、25%、12.5%の検体を調製した。それら検体100 μ lにフィブリン析出阻害試薬として、3mmol/l DTTと0.4mol/lヨウ化ナトリウムを含む溶液50 μ l添加後、37 $^{\circ}$ C、2分間加温後、80mmol/l塩化カルシウム、0.4mol/l HEPES pH6.6で溶解したトロンビン100NIHU/ml溶液100 μ lを添加し、凝固時間を凝固時間測定機器KC-4で測定した。

その結果を図1に示す。

方法1としてのフィブリノゲンを試薬として用いない第XIII因子活性

測定で、第XIII因子活性と凝固時間は両対数グラフ上で直線関係が認められ、第XIII因子活性が定量性よく測定された。

実施例 4

市販管理正常血漿カリプラズマ(第XIII因子活性を100%とする)と第XIII因子欠乏血漿(第XIII因子活性を0%とする)を混合し、第XIII因子活性100%、50%、25%、12.5%の検体を調製した。それから検体50 μ lに0.3mol/l塩化ナトリウムで溶解したヒト血漿由来フィブリノゲン15mg/mlの溶液50 μ lを加え、さらにフィブリン析出阻害試薬として、40mmol/l DTTと0.1mol/lヨウ化ナトリウムを含む溶液50 μ l添加後、37℃、2分間加温後、40mmol/l塩化カルシウム、0.4mol/l HEPES pH6.6で溶解したトロンビン100NIHU/ml溶液100 μ lを添加し、凝固時間を凝固時間測定機器KC-4で測定した。その結果を図2に示す。

方法2としてのフィブリノゲンを試薬として用いる方法で、第XIII因子活性と凝固時間は片対数グラフ上(横軸が対数軸である)で直線関係が認められ、第XIII因子活性が定量性よく測定された。

実施例 5

トロンビン(濃度100NIHU/ml)、カルシウムイオン(濃度80mmol/l)およびHEPES 0.4mol/l、pH6.6よりなるトロンビン溶液と、フィブリン析出阻害剤としてのDTT(3mmol/l)、ヨウ化ナトリウム(0.4mol/l)よりなるフィブリン析出阻害剤溶液とを組み合わせることで本発明の第XIII因子活性測定用試薬キットを得た。

実施例 6

フィブリノゲン(濃度15mg/ml)、塩化ナトリウム(濃度0.3mol/l)よりなるフィブリノゲン溶液と、トロンビン(濃度100NIHU/ml)

ml)、カルシウムイオン(濃度40mmol/l)およびHEPES 0.4 mol/l、pH6.6よりなるトロンビン溶液と、フィブリン析出阻害剤としてのDTT40mmol/l、ヨウ化ナトリウム0.1mol/lよりなるフィブリン析出阻害剤溶液とを組み合わせる本発明の第XIII因子活性測定用試薬キットを得た。

以上述べた通り、本発明の第XIII因子活性測定方法は第XIII因子の生体内での反応に近い反応系を利用する方法であり、測定感度が高く、かつ正確な値を得ることができる方法である。また、その測定操作は極めて簡単であり、迅速に行うことができ、通常の臨床検査に適用できる有用な方法である。

請 求 の 範 囲

1. 検体とフィブリン析出阻害剤とを混合した後、トロンビン溶液を加え、カルシウムイオン存在下でフィブリン凝固時間を測定し、その凝固時間を標準の凝固時間と比較して検体中の第XIII因子活性を求めることを特徴とする第XIII因子活性測定方法。

2. 検体と、フィブリノゲンと、フィブリン析出阻害剤とを混合した後、トロンビン溶液を加え、カルシウムイオン存在下でフィブリン凝固時間を測定し、その凝固時間を標準の凝固時間と比較して検体中の第XIII因子活性を求めることを特徴とする第XIII因子活性測定方法。

3. トロンビンと、カルシウムイオンと、フィブリン析出阻害剤とからなる、第XIII因子活性を凝固時間法で測定することを特徴とする第XIII因子活性測定用試薬キット。

4. フィブリノゲンと、トロンビンと、カルシウムイオンと、フィブリン析出阻害剤とからなる、第XIII因子活性を凝固時間法で測定することを特徴とする第XIII因子活性測定用試薬キット。

図 1

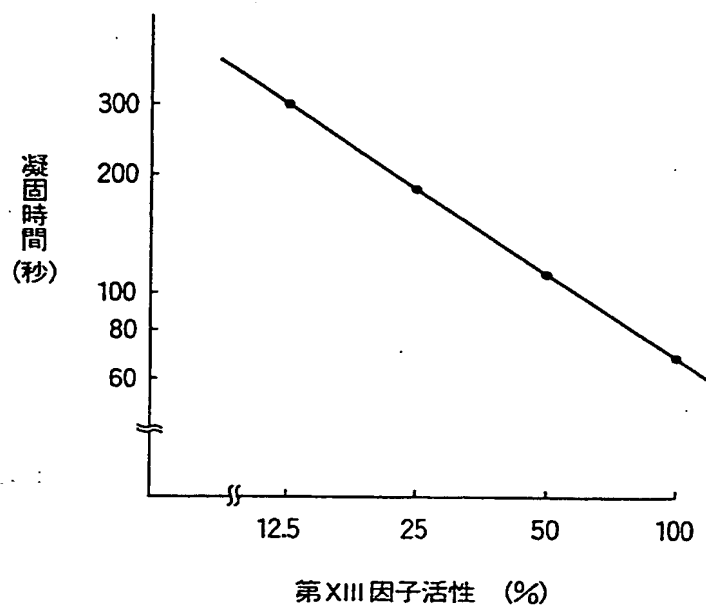
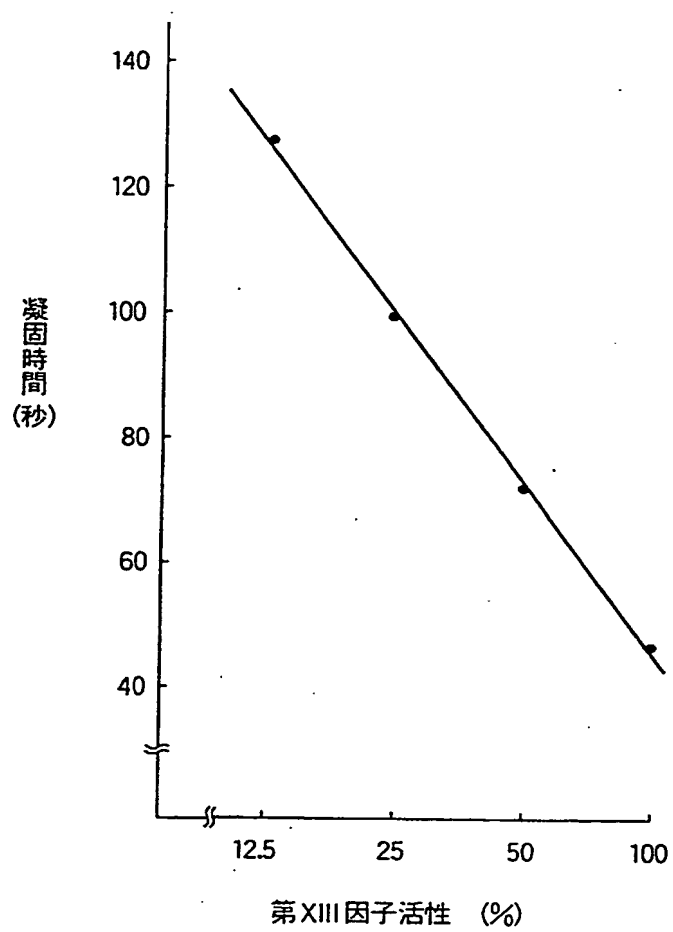


図 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01247

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ G01N33/86, C12Q1/56

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ G01N33/86, C12Q1/56

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926 - 1993

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1993

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 3-67173 (Shimizu Seiyaku K.K.), March 22, 1991 (22. 03. 91), Claim 1 (Family: none)	3, 4
P	JP, A, 5-60763 (Toa Medical Electronic Co., Ltd.), March 12, 1993 (12. 03. 93), Claim 1 & EP, A1, 535799	3, 4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

October 12, 1993 (12. 10. 93)

Date of mailing of the international search report

November 2, 1993 (02. 11. 93)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ G01N33/86, C12Q1/56		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ G01N33/86, C12Q1/56		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1926-1993年 日本国公開実用新案公報 1971-1993年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 3-67173 (清水製薬株式会社) 22. 3月. 1991 (22. 03. 91), 第1クレーム (ファミリーなし)	3, 4
P	JP, A, 5-60763 (東亜医用電子株式会社) 12. 3月. 1993 (12. 03. 93), 第1クレーム & EP, A1, 535799	3, 4
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
12. 10. 93	02.11.93	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 吉田 禎 治 ㊟	2 J 7 0 5 5
	電話番号 03-3581-1101 内線	3250

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.